

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018962

International filing date: 13 December 2004 (13.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-418560
Filing date: 16 December 2003 (16.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 04 February 2005 (04.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

13.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年12月16日
Date of Application:

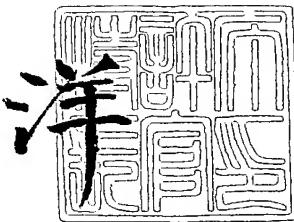
出願番号 特願2003-418560
Application Number:
[ST. 10/C] : [JP2003-418560]

出願人 キヤノン株式会社
Applicant(s):

2005年 1月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 259522
【提出日】 平成15年12月16日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12M 3/06
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 鹿目 修
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 渡辺 耕平
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 宮崎 健
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都世田谷区代沢2-37-5
 【氏名】 松田 良一
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都西東京市田無町1-4-1
 【氏名】 藤山 朋代
【特許出願人】
 【識別番号】 000001007
 【氏名又は名称】 キヤノン株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100123788
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 宮崎 昭夫
 【電話番号】 03-3585-1882
【選任した代理人】
 【識別番号】 100088328
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 金田 暢之
【選任した代理人】
 【識別番号】 100106297
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 伊藤 克博
【選任した代理人】
 【識別番号】 100106138
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 石橋 政幸
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 201087
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項1】**

基板に細胞を培養する培養領域の1以上を設けた細胞培養用基板において、細胞に対して生物活性を有する生物活性物質の保持領域および固定化領域の両方を有する培養領域の1以上を有することを特徴とする細胞培養用基板。

【請求項2】

各培養領域内の前記保持領域及び固定化領域の少なくとも一方に、複数の生物活性物質が保持又は固定化されている請求項1に記載の細胞培養用基板。

【請求項3】

前記保持領域にある生理活性物質が該保持領域と接した際に培養液中に遊離可能に保持されている請求項1または2に記載の細胞培養用基板。

【請求項4】

各培養領域内の前記保持領域及び固定化領域の少なくとも一方が複数設けられている請求項1～3のいずれかに記載の細胞培養用基板。

【請求項5】

前記保持領域および前記固定化領域に、生物活性物質の種類または複数の生理活性物質の組み合わせが異なる領域の組み合わせが1以上含まれている請求項1～4のいずれかに記載の細胞培養用基板。

【請求項6】

前記保持領域および前記固定化領域に、生物活性物質の密度が異なる領域の組み合わせが1以上含まれている請求項1～5のいずれかに記載の細胞培養用基板。

【請求項7】

前記培養領域が前記基板の表面に形成された凹部内に形成されている請求項1～6のいずれかに記載の細胞培養用基板。

【請求項8】

前記培養領域が壁状構造物により囲まれている請求項1～6のいずれかに記載の細胞培養用基板。

【請求項9】

前記保持領域及び固定化領域の少なくとも一方に、前記基板表面に設けられた担持層を介して生物活性物質が保持または固定化されている領域が含まれている請求項1～8のいずれかに記載の細胞培養用基板。

【請求項10】

前記保持領域は、前記培養領域の下端から所定の高さに設けられている請求項1～9のいずれかに記載の細胞培養用基板。

【請求項11】

同一培養領域内に、その下端からの距離が異なる位置に設けられた2以上の保持領域を有する請求項10に記載の細胞培養用基板。

【請求項12】

前記保持領域から、前記生物活性物質の徐放が可能、もしくは徐放性を付与した生物活性物質を遊離できることを特徴とする請求項1～11に記載の細胞培養基板。

【請求項13】

前記培養領域が凹部中に設けられ、その壁面の少なくともひとつの面は、底部から上部に向かって傾斜しており、かつ該凹部の底面積より開口部の面積の方が広くなっている請求項1～12のいずれかに記載の細胞培養用基板。

【請求項14】

請求項1～13のいずれかに記載の細胞培養用基板の製造方法であって、前記保持領域及び固定化領域の少なくとも1つへの生物活性物質の付与に液体吐出手段を用いることを特徴とする細胞培養用基板の製造方法。

【請求項15】

前記液体吐出手段が、サーマルインクジェット方式による吐出手段である請求項14に

記載の細胞培養用基板の製造方法。

【請求項16】

前記液体吐出手段が、ピエゾインクジェット方式による吐出手段である請求項14に記載の細胞培養用基板の製造方法。

【請求項17】

前記生物活性物質の固定を外部から固定用のエネルギーを加えて行う工程をさらに含む請求項14～16のいずれかに記載の細胞培養用基板の製造方法。

【請求項18】

請求項1～13のいずれかに記載の細胞培養用基板を用いた細胞スクリーニング法であつて、

前記培養領域に培養液を充填し、該培養領域中の固定化領域に固定された生物活性物質に培養液を接触させた状態で細胞を培養する工程と、

培養液を前記保持領域と接触させて該保持領域にある生物活性物質を培養液中に遊離させる工程と、

を有することを特徴とする細胞スクリーニング法。

【請求項19】

培養液中に細胞のスクリーニングに必要な物質を補充する工程を有する請求項18に記載の細胞スクリーニング法。

【請求項20】

細胞の形態変化を観察する工程を更に含む請求項18または19に記載の細胞スクリーニング法。

【請求項21】

評価の際に細胞を染色する請求項20に記載の細胞スクリーニング法。

【請求項22】

細胞内で合成された物質の定量を行う工程を含む請求項18～21のいずれかに記載の細胞スクリーニング法。

【請求項23】

細胞内に取り込まれた物質の定量を行う工程を含む請求項18～21のいずれかに記載の細胞スクリーニング法。

【請求項24】

放射線量測定、蛍光量測定、発光量測定および吸光度測定の少なくとも1種により前記物質の定量を行う工程を含む請求項22または23に記載の細胞スクリーニング法。

【書類名】明細書

【発明の名称】細胞培養用基板、その製造方法、それを用いた細胞スクリーニング法

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞に対して生物活性を有する生物活性物質を特定するために用いることのできる細胞培養用基板、その製造方法、それを用いた細胞スクリーニング法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、動植物の細胞を種々の条件下において培養する研究、あるいは特定の培養細胞による産生物の研究が活発に行われており、特に人工的には合成が不可能であるか、あるいは合成が極めて困難な物質を特定の細胞活動を利用して製造することが多方面において検討されている。また、細胞の増殖・分化に影響を与える物質を特定し、目的に応じて所望の細胞を増殖、分化させようという研究が行われており、細胞工学や医工学の急速な進歩とともに、細胞を用いた超小型バイオセンサーや人工臓器、更にはニューロコンピュータなどが注目を集め、これらに応用すべく活発な研究活動がなされている。しかしながら前述のように生体外で細胞を利用するには、細胞を望むように配列させ、その増殖、分化や物質産出を制御することが不可欠であるが、細胞を配列させ、その増殖、分化や物質産生を制御する機構が十分解明されておらず、この様な観点で細胞を制御しながら培養することは極めて困難で、前述のような細胞を利用した研究開発の進展の大きな障壁となっている。

【0003】

また、薬剤の感受性に対する個人差に起因する問題を考慮したテラーメード医療の概念は近年広く認知されており、そのニーズは高まっているが、これまでには、特に技術的理由のために、生物活性を持つ物質の影響については個々の物質の機能についてのみ研究が行われおり、複数の薬剤の効果の有無や必要量、組み合わせの効果などを簡便に調べる有効な手法が確立されていないという課題があった。

【0004】

細胞の配列を制御する試みとしては、USP5108926号公報のように、インクジェットプリンタを用いて細胞接着性蛋白質を塗布してパターンを形成し、この上で細胞を培養した例がある。この方法では、細胞接着性蛋白質が塗布されたパターン上で細胞を培養することはできるが、その増殖・分化や物質産出の制御を行い、細胞をスクリーニングすることはできない。また、「蛋白質・核酸・酵素」、45巻、727～734(2000)では、細胞の増殖・分化に影響を与える細胞成長因子を基板上にフォトリソグラフィ技術を用いて固定化し、細胞の増殖・分化に与える影響の検討をしている。しかしながら、細胞成長因子を固定化した基板を細胞のスクリーニング手段として用いておらず、また、フォトリソグラフィ法では、生体内に少量しか存在しないこれら生体物質を浪費し、露光、現像といったプロセスを繰り返さなければならず製造工程が複雑となる。

【0005】

また、特表2000-512009号公報では、細胞接着性に影響を与える物質を基板上に固定化し、細胞のスクリーニングを行う方法について提案がなされている。ここでは、基板上に設けられた反応性官能基と細胞接着性物質を二価の架橋試薬により固定化している。反応性官能基と細胞接着性物質を結合させる際にフォトリソグラフィを用いており、前述したことと同様の課題が生じるだけでなく、複数の細胞接着性物質を固定化する際には、すでに固定化されている物質と新たに固定化する物質が所望でない位置で二価の架橋試薬で結合されることを回避することは極めて困難で、所望の位置に、細胞接着性物質を配置することは極めて困難である。また、増殖や分化、更には、物質産出に影響する物質を固定化することなく、細胞を各ウェルに接着性物質により固定化し、培養液により培養される過程で細胞が産生する物質を捉えることで細胞をスクリーニングするものであり、本発明のように細胞の接着性や増殖、分化、生存、未分化状態の維持、細胞死及び物質産出の少なくとも1つに影響する物質をスクリーニングするためのものではない。

【0006】

また、特開2002-355025号公報では複数の細胞スクリーニング物質を、液体吐出手段でベース上の所望の領域に配置して固定化し、異なる細胞スクリーニング機能を有する複数の領域を有することを特徴とする細胞スクリーニング基板を形成する方法が開示されている。この発明では細胞スクリーニング物質が培養液中でスクリーニング基板にすべて固定化されているために細胞内に細胞スクリーニング物質が取り込めない場合が多い。そのため、この発明は、細胞内に細胞スクリーニング物質が取り込まれることによって増殖、分化、生存、未分化状態の維持、細胞死及び物質産出の少なくとも1つに影響する細胞をスクリーニングする場合を除き有効な提案である。

【0007】

また、特開2002-328124号公報は生物活性物質の高次数の組み合わせをスクリーニングすることを目的としているが、該発明ではあらかじめ基板に付与された生物活性物質の作用についての効果を見るものであり、生体内において細胞外基質に固定化された状態で作用する生物活性物質の効果や、細胞の培養過程において、生物活性物質の逐次的な添加により引き起こされる効果についてスクリーニングすることはできなかった。

また、特開2003-33177号公報は、多種の薬物・毒物などの化学物質を簡便にアッセイするために複数の領域に分割された細胞アレイを作成し、得られた各領域に生物活性物質を付与して同時に多検体のスクリーニングを行うものであるが、該発明では、培養中の細胞に対して、いちいちディスペンス手段を用いて生物活性物質を付与するために、その工程でのコンタミネーションの危険性や、専用の生物活性物質の付与装置を構築する必要があり、簡便に用いることはできなかった。

【特許文献1】米国特許第5108926号明細書

【特許文献2】特表2000-512009号公報

【特許文献3】特開2002-355025号公報

【特許文献4】特開2002-328124号公報

【特許文献5】特開2003-33177号公報

【非特許文献1】「蛋白質・核酸・酵素」、45巻、727～734(2000)

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0008】**

従って、本発明の目的は、上述の従来例の持つ課題を解消せしめ、簡便な工程で固定化状態および溶解状態の複数の生物活性物質の効果を同時にみることができる細胞培養用キット、その製造方法、およびそれを用いたスクリーニング法を提供し、細胞工学などの研究をさらに発展させ、また細胞を利用した各種デバイスを作製するための基盤となる技術を提供することにある。また、本発明の目的は、これら細胞培養用キットを用いて、細胞に対して作用を持つあらゆる生物活性物質の少なくとも1つに影響する物質のスクリーニングを行う方法を提供するものである。さらに、本発明の目的は、細胞を用いて有用な生物活性物質のスクリーニングを行う方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】**【0009】**

本発明には以下の各態様が含まれる。

- (1) 基板に細胞を培養する培養領域の1以上を設けた細胞培養用基板において、細胞に対して生物活性を有する生物活性物質の保持領域および固定化領域の両方を有する培養領域の1以上を有することを特徴とする細胞培養用基板。
- (2) 各培養領域内の前記保持領域及び固定化領域の少なくとも一方に、複数の生物活性物質が保持又は固定化されている上記(1)項に記載の細胞培養用基板。
- (3) 前記保持領域にある生理活性物質が該保持領域と接した際に培養液中に遊離可能に保持されている上記(1)または(2)項に記載の細胞培養用基板。
- (4) 各培養領域内の前記保持領域及び固定化領域の少なくとも一方が複数設けられている上記(1)～(3)項のいずれかに記載の細胞培養用基板。

(5) 前記保持領域および前記固定化領域に、生物活性物質の種類または複数の生理活性物質の組み合わせが異なる領域の組み合わせが1以上含まれている上記(1)～(4)項のいずれかに記載の細胞培養用基板。

(6) 前記保持領域および前記固定化領域に、生物活性物質の密度が異なる領域の組み合わせが1以上含まれている上記(1)～(5)項のいずれかに記載の細胞培養用基板。

(7) 前記培養領域が前記基板の表面に形成された凹部内に形成されている上記(1)～

(6) のいずれかに記載の細胞培養用基板。

(8) 前記培養領域が壁状構造物により囲まれている上記(1)～(6)項のいずれかに記載の細胞培養用基板。

(9) 前記保持領域及び固定化領域の少なくとも一方に、前記基板表面に設けられた担持層を介して生物活性物質が保持または固定化されている領域が含まれている上記(1)～

(8) 項のいずれかに記載の細胞培養用基板。

(10) 前記保持領域は、前記培養領域の下端から所定の高さに設けられている上記(1)～(9)項のいずれかに記載の細胞培養用基板。

(11) 同一培養領域内に、その下端からの距離が異なる位置に設けられた2以上の保持領域を有する上記(10)項に記載の細胞培養用基板。

(12) 前記保持領域から、前記生物活性物質の徐放が可能、もしくは徐放性を付与した生物活性物質を遊離できることを特徴とする上記(1)～(11)に記載の細胞培養基板。

(13) 前記培養領域が凹部中に設けられ、その壁面の少なくともひとつの面は、底部から上部に向かって傾斜しており、かつ該凹部の底面積より開口部の面積の方が広くなっている上記(1)～(12)項のいずれかに記載の細胞培養用基板。

(14) 上記(1)～(13)項のいずれかに記載の細胞培養用基板の製造方法であって、前記保持領域及び固定化領域の少なくとも1つへの生物活性物質の付与に液体吐出手段を用いることを特徴とする細胞培養用基板の製造方法。

(15) 前記液体吐出手段が、サーマルインクジェット方式による吐出手段である上記(14)項に記載の細胞培養用基板の製造方法。

(16) 前記液体吐出手段が、ピエゾインクジェット方式による吐出手段である上記(14)項に記載の細胞培養用基板の製造方法。

(17) 前記生物活性物質の固定を外部から固定用のエネルギーを加えて行う工程をさらに含む上記(14)～(16)項のいずれかに記載の細胞培養用基板の製造方法。

(18) 上記(1)～(13)項のいずれかに記載の細胞培養用基板を用いた細胞スクリーニング法であって、

前記培養領域に培養液を充填し、該培養領域中の固定化領域に固定された生物活性物質に培養液を接触させた状態で細胞を培養する工程と、

培養液を前記保持領域と接触させて該保持領域にある生物活性物質を培養液中に遊離させる工程と、

を有することを特徴とする細胞スクリーニング法。

(19) 培養液中に細胞のスクリーニングに必要な物質を補充する工程を有する上記(18)項に記載の細胞スクリーニング法。

(20) 細胞の形態変化を観察する工程を更に含む上記(18)または(19)項に記載の細胞スクリーニング法。

(21) 評価の際に細胞を染色する請求項20に記載の細胞スクリーニング法。

(22) 細胞内で合成された物質の定量を行う工程を含む上記(18)～(21)項のいずれかに記載の細胞スクリーニング法。

(23) 細胞内に取り込まれた物質の定量を行う工程を含む上記(18)～(21)項のいずれかに記載の細胞スクリーニング法。

(24) 放射線量測定、蛍光量測定、発光量測定および吸光度測定の少なくとも1種により前記物質の定量を行う工程を含む上記(22)または(23)項に記載の細胞スクリーニング法。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、本発明にかかるスクリーニングの結果、たとえば、細胞の増殖・分化、生存および未分化状態の維持、細胞死または、物質産出に必要な因子を特定でき、細胞を効率的に培養するための方法を決定することが可能となる。また、固相だけでなく、液相のスクリーニング物質も用いることができるるので、固定化状態の生物活性物質と、溶解状態の生物活性物質の組み合わせによる、より生体内に近い状態でのスクリーニングができる。さらに、固相と液相での効果の違いの検討、また、例えば、薬剤や、いわゆる環境ホルモンといわれる内分泌搅乱物質に対する人の感受性を評価することが可能となる。更に、これらの評価結果に基づいて、種々の疾患に対する人それぞれの診断法を決定することができる。また、細胞を用いて細胞に対して生理活性を持つ有用な生物活性物質のスクリーニングを行うことができる。

【0011】

また、本発明の細胞培養用基板は液体吐出手段としてインクジェット方式を用いる事ができるため、多種の細胞スクリーニング物質を同時に、また液滴数を制御することによって濃度変化をつけて細胞に作用させることができある。また、数種類の細胞スクリーニング物質を混ぜ合わせて精度良く細胞培養液に再溶解できるため、従来は難しかった多元系の生物活性物質による細胞の増殖・分化、生存に対する効果が正確にわかる。また、生物活性物質の逐次的な添加や異なる組み合わせへの変更が容易である。従って、これら条件により引き起こされる効果についてのスクリーニングも簡便に可能になり有効である。また、本発明の細胞培養用基板は簡単に製造できるため多量に製造し、細胞スクリーニング用基板として安定に保存し、適宜使用できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明の最良の形態は、細胞の接着、増殖、分化、生存、未分化状態の維持及び細胞死から選ばれる少なくとも一つの機能に影響を与える生物活性物質を該基板1に仮固定せしめることによって形成されてなる該生物活性物質を有する細胞培養用基板1にある。生物活性物質は、上記のように基板1への細胞の接着位置の制御、増殖の程度の制御（促進する場合や抑制する場合を含む）、分化の制御（促進する場合や抑制する場合を含む）、生存、未分化状態の維持、更には細胞死（アポトーシス）から選ばれる少なくとも1つの機能に影響を与える物質であることが好ましい。このような物質の例には、例えば細胞外基質蛋白質や細胞の表面と特異的結合能を有する抗体、サイトカインの他、細胞と結合、あるいは、細胞内に取り込まれ、細胞の増殖、分化に影響を与える化学物質などが含まれる。また、細胞外基質蛋白質の例は、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどを含む。また、サイトカインは、例えば細胞成長因子やホルモンと呼ばれるものを含み、細胞成長因子は、例えば神経成長因子（NGF）、上皮細胞成長因子（EGF）、塩基性纖維芽細胞成長因子（bFGF）、骨形成因子（BMP-2）、インシュリン様成長因子（IGF-I）、腫瘍壞死因子（TNF）などを含む。また、ホルモンの例はインスリンやアドレナリンなどを含む。1箇所の仮固定化にて基板1に仮固定されている生物活性物質は、1種類でも2種類以上でもよい。例えば、異なる機能を有する2種類以上の生物活性物質を同一仮固定化内に仮固定することにより、細胞の接着、増殖、分化、生存、未分化状態の維持及び細胞死から選ばれる少なくとも1つの更に高度な制御が可能となる。生物活性物質は、PVA（ポリビニルアルコール）などのバインダーに溶液状態で吸収されることにより基板1の所定の場所に仮固定することができる。あるいは、数μ1以下程度の微量の液体状態であれば、溶液のままベース11及び/または壁面14及び/またはステージ15に付着させ、乾燥させることで仮固定することも可能である。また、互いに離間した複数の仮固定化において、基板1の所定の場所に仮固定されている生物活性物質は、必ずしも同一である必要はなく、細胞培養の目的に応じて各仮固定化に含まれている生物活性物質が異種のものであってよい。また、1つの固定化領域で複数の生物活性物質が基板1の所定の場所に固定されている場合、互いに離間している複数の仮固定化で、複数の生物活性物質の組み合わせは同じ

であってもよく、また異なっていてもよい。また、複数の互いに離間している仮固定化における生物活性物質の組合せが同じ場合でも、その濃度比を異ならせることも有用である。かかる基板1を用いることで、多種条件下で細胞の接着性、増殖、分化、未分化状態の維持、細胞死などから選ばれる少なくとも1つの機能を制御して培養することができる。複数の生物活性物質の協働が、細胞培養に影響を与える可能性を考慮すると、この様に複数の仮固定化で、生物活性物質の組合せや、濃度比を変化させることで、如何なる環境が細胞培養に最も大きな影響を与えるものであるか、といった情報の取得も可能となる。本発明の細胞培養基板1中のステージ15は、1個でも複数でもよく、複数の場合はベース11からの高さを異なったものにしておくと生物活性物質を供給するタイミングによる影響を調べるのに効果的である。複数の仮固定化を培養基板1中のベース11及び/または壁面14及び/またはステージ15での高さを変えて配置し、培養中の培養液の量を徐々に増やしながら培養を行うことにより複数の生物活性物質の投与を時間を追って管理することが可能になる。

【0013】

本発明において用いることのできる細胞としては、原核および真核細胞であればどんなものでも用いることができる。たとえば、細菌細胞、酵母細胞、ニューロン、纖維芽細胞、平滑筋細胞、骨格筋細胞、グリア細胞、胎性幹細胞、造血幹細胞、肥満細胞、脂肪細胞、原生動物細胞、神経幹細胞、ならびにT細胞およびB細胞を含む免疫細胞などの細胞全体(例えば、形質転換細胞または非形質転換細胞)、細胞塊などを適宜選択して使用できる。

本発明に用いる基板のベース11及び/または壁面14及び/またはステージ15を形成する材料は、生物活性物質を安定して仮固定できるものであれば材質や形状はいずれでもよい。具体的には、ガラス基板、プラスチックプレート、プラスチックシート、ポリマーフィルム、紙などを好適に用いることができる。さらに基板1は透明であっても、遮光性のものであっても、さらには着色されていてもよい。また、ベース11または壁面14及び/またはステージ15上に生物活性物質を仮固定するため、あるいは、ベース11及び/または壁面14及び/またはステージ15上での生物活性物質の安定性を高めるため、ベース11及び/または壁面14及び/またはステージ15上の一部、あるいは全面を化学物質により処理したり、放射線を照射したりする処理を行っても良い。ステージ15がない場合には、壁面14は仮固定領域を設けるために傾斜していると好ましい。傾斜角度は、垂直に近いと細胞培養基板を作製する場合に仮固定領域の高さを調整しにくく、角度が浅いとウェルの密度が上がらないために、25~65度程度がよい。細胞培養基板の凹部、凸状の壁状構造物、壁面の傾斜の部分を形成するための方法としては、インジェクション成形、注型成形、チップを熱融着あるいは接着剤によって貼り合わせて成形する方法、金型等でプレス成形する方法などを用いることが出来る。

【0014】

また、ベース11及び/または壁面14及び/またはステージ15は、生物活性物質が仮固定されている個々の領域、または、2つ以上の仮固定化から形成される仮固定化群は基板表面に形成された凹部(窪み又はウェル)内に形成されていてもよい。このことにより、液体吐出手段により配置される液滴の基板の所定位置への配置を容易にすることができます、更に、ウェルにより連結されている個々の領域または領域群ごとに培養液を変えて細胞を培養することができる。

【0015】

以上説明した構成による細胞培養用基板1の製造方法の具体例について図1を用いて説明する。ベース11は、まず、必要に応じて前述した処理を行ってもよい。具体的には、ベース11の洗浄を行い、所望でない物質を取り去ったり、紫外線をはじめとする放射線の照射やコロナ放電を行ったりすることなど様々な化学的物理的処理を行うことができる。また、ポリマー材料やシランカップリング剤などを必要に応じてベース11および/または壁面14及び/またはステージ15上的一部あるいは全面に塗布してもよい。

【0016】

このようなベース 1 1 および/または壁面 1 4 及び/またはステージ 1 5 上に生物活性物質を配置する。配置には、例えば液体吐出手段 1 3 を用いる。液体吐出手段とは、1滴あたりの体積が例えば 1 0 0 n l 以下、より具体的には例えば 1 p l ~ 1 n l 程度の液滴を吐出可能なもので、マイクロピペット、マイクロディスペンサー、インクジェット方式を用いた吐出装置が挙げられる。吐出装置が安価に作製、入手でき、微小な液滴を制御された位置に吐出できる点でインクジェット法を用いた吐出装置を特に好適に用いることができる。さらにインクジェット法の中でも、サーマルインクジェット方式とピエゾインクジェット方式を好適に用いることができ、サーマルインクジェット法による吐出装置は、吐出口の微細加工が容易で、生物活性物質を含む液体を高密度に所定の位置に吐出することができ、その結果として生物活性物質をベース 1 1 上に高精度に配置することができる。また、ピエゾインクジェット法による吐出装置は、圧電素子の変位により、吐出エネルギーを発生させて、生物活性物質に熱的なストレスを付加することなく、生物活性物質を含む液体 1 2 を安定して吐出できる。

【0017】

また、生物活性物質は、吐出のために適切な溶媒に溶解、もしくは分散される。溶媒(分散媒)としては、生物活性物質を安定して溶解もしくは分散させることができるものであればいずれでもよいが、水が好適に用いられる。水の量は30質量%以上、好ましくは50質量%以上含まれている方がよい。水としてはイオン交換水(脱イオン水)や生物活性物質を安定して溶解させるため種々の緩衝液を使用するのが好ましい。また、必要に応じて水溶性溶剤を用いることができる。水溶性溶剤の量は、1種類あたり50質量%以下、好ましくは30質量%以下の範囲で添加するのがよい。水溶性溶剤は水に溶解するものであればいずれでもよく、例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、n-ブチルアルコール、sec-ブチルアルコール、tert-ブチルアルコール等の炭素数1~4のアルキルアルコール類；ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等のアミド類；アセトン、ジアセトンアルコール等のケトンまたはケトアルコール類；テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類；ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール等のポリアルキレングリコール類；エチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、トリエチレングリコール、1,2,6-ヘキサントリオール、チオジグリコール、ヘキシレングリコール、ジエチレングリコール等のアルキレン基が2から6個の炭素原子を含むアルキレングリコール類；グリセリン；エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル、エチレングリコールモノブチルエーテル、ジエチレングリコールモノメチルエーテル、ジエチレングリコールモノエチルエーテル、ジエチレングリコールモノブチルエーテル、トリエチレングリコールモノメチルエーテル、トリエチレングリコールモノブチルエーテル等の多価アルコールの低級アルキルエーテル類；N-メチル-2-ピロリドン、2-ピロリドン、1,3-ジメチル-2-イミダゾリン等が挙げられる。これらの1種又は2種以上を適宜選択して使用できる。これらの多くの水溶性有機溶剤の中でもジエチレングリコールなどの多価アルコール、トリエチレングリコールモノメチルエーテル等の低級アルキルエーテルが好ましい。これらの中でもエタノールあるいはイソプロピルアルコール、又は多価アルコールの低級アルキルエーテル類を添加することによって、サーマルジェットタイプの場合には、インクジェットの吐出口内の薄膜抵抗体上での生物活性物質付与用の発泡をより安定に行うことができるため好適に用いることができる。

[0018]

また、本発明にかかる少なくとも生物活性物質を含む液体12には、親水性樹脂の少なくとも1種を含有させることができ。この親水性樹脂としては、例えば、リグニンスルホン酸塩、セラック等の天然高分子、ポリアクリル酸塩、ステレンーアクリル酸共重合塩、ステレンーアクリル酸ーアクリル酸エチル共重合物塩等の、ステレンーアクリル酸ーアクリル酸アルキルエステル共重合物塩、ステレンーマレイン酸共重合物塩、ステレンーマレイン酸ーアクリル酸アルキルエステル共重合物塩、ステレンーマレイン酸ハーフエステル共重合物塩、ステレンーメタクリル酸共重合物塩、ビニルナフタレンーアクリル酸共

重合塩ビニルナフタレン-マレイン酸共重合物塩、 β -ナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合塩、ポリリン酸塩等の陰イオン性高分子、ポリビニルアルコール、メチロール化メラミンポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース等のセルロース誘導体等が挙げられる。本発明においては、これらの樹脂のうちから1種類を選択して、或いは、これらの中の2種類以上を混合して用いることができる。その他のものとして、例えば、アルブミン、ゼラチン、カゼイン、でんぶん、カチオン化でんぶん、アラビアゴム、及びアルギン酸ソーダ等の天然樹脂等、多数を列挙することができる。勿論、本発明は、これらに限定されるものではない。担持層の構成を選択することで、担持層に付着した生物活性物質の培養液への徐放性を得ることができ。また、この徐放性は、生物活性物質を付与する際に、生物活性物質を含む液体中に徐放性を付与し得る物質（例えば水溶性のスチレンーアクリル樹脂など）を添加しておくことにより得ることも可能である。生物活性物質を含む液体中に加える徐放性を付与し得る物質の量としては、10質量%以下、好ましくは5質量%以下がよい。上記親水性樹脂の量は、1種類あたり10質量%以下、好ましくは5質量%以下の範囲で添加するのがよい。

【0019】

また、本発明にかかる少なくとも生物活性物質を含む液体12には、上記成分のほかに必要に応じて所望の物性値を持つ溶液とするために、界面活性剤、消泡剤、防腐剤、無機塩類、有機塩類等を添加することができる。例えば、界面活性剤としては生物活性物質に対し、保存安定性等の悪影響を及ぼさないものであればいずれでも用いることができ、例えば、脂肪酸塩類、高級アルコール硫酸エステル塩類、液体脂肪油硫酸エステル塩類、アルキルアリルスルホン酸塩類等の陰イオン界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルエーテル類、ポリオキシエチレンアルキルエステル類、ポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル類、アセチレンアルコール、アセチレングリコール等の非イオン性界面活性剤があり、これらの1種又は2種以上を適宜選択して使用できる。微小液滴手段によりベース1上の所望の位置に生物活性物質を配置すると同時に、生物活性物質をベース11および/または壁面14及び/またはステージ15及び/またはステージ15上に仮固定する。ベース11および/または壁面14及び/またはステージ15上に生物活性物質を仮固定するために、前記した様に、生物活性物質に予め仮固定の為の処理を施してもよいし、ベース11および/または壁面14及び/またはステージ15及び/またはステージ15上に予め仮固定に必要な処理を施しておいてもよい。例えば、アラビアゴム、カンテン、ゼラチン、デンプン、トラガント、結晶セルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、酢酸フタル酸セルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、ポリビニルアルコール、メタアクリル酸コポリマーなどの樹脂などの水溶性高分子等を水溶液として塗布したり、これらをバインダーとして有機、無機の各種微粒子を分散したものとして塗布したりして仮固定化領域を作成しても良い。以上のようにして細胞培養用基板1が作製できる。

【0020】

次に前述した細胞培養用基板1を用いた細胞培養方法について述べる。このような細胞培養基板1の少なくとも一部の仮固定化がある時点から培養液と接触する状態において細胞を培養することにより、細胞の接着、増殖、分化、生存、未分化状態の維持、細胞死から選ばれる少なくとも一つを制御しながら細胞を培養することができる。細胞は特に制限されるものはないが、好ましくは、仮固定した物質により上記した何れかの機能が影響を受ける可能性のある細胞である。細胞を培養する前に必要に応じて細胞培養用基板1上に紫外線などを照射することにより殺菌処理してもよい。これにより所望でない微生物などにより培養が阻害されないようにすることができます。なお、細胞培養用基板1全体を培養液に浸漬して細胞培養を行ってもよいが、少なくとも生物活性物質が仮固定されている領域がある時点から培養液と接触していれば、細胞の生物活性の少なくとも一つを制御しながら培養することは可能である。また、細胞培養用基板1上で細胞を培養している際、あるいは一定期間の細胞培養後、培養液を交換して培養してもよいし、光や放射線を照射し

てもよい。これにより細胞の増殖、分化を変化させたり、基板上への接着性を変化させたりすることができる。また、培養液の流れを生物活性物質に対して接触させて、すなわち培養液を灌流させて培養を行ってもよい。また、細胞培養用基板1上で細胞を培養している際、あるいは一定期間の細胞培養後、培養細胞群を基板上から取り外してもよい。こうすることで培養細胞が取り除かれた基板を再度利用することができ、また、取り外した培養細胞群を人工的に作製した生体組織あるいはその一部として利用することができる。

【0021】

この基板の再利用は生物活性物質を基板に固定したことで、細胞が当該スクリーニング（物質を代謝系に取り込めなくしたことによって得られる効果の一つである。また、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）のような温度応答性高分子を予め基板上に塗布し、その上で細胞培養すると、温度を約30℃にすれば、培養された細胞群はポリマー表面の親水性の変化により基板から取り外すことができる。これにより細胞群を生体組織などに利用することができる。

【0022】

細胞内で合成された物質や細胞内に取り込まれた物質の定量方法には、放射性化合物より放出される放射線量を測定する方法や、蛍光物質で標識された物質から発せられる蛍光量を測定する方法、更には、発光物質から発せられる発光量を測定する方法や色素の吸光度を測定する方法がある。

【0023】

放射性化合物より放出される放射線量を測定する方法では、水素、炭素、窒素、リン、硫黄などの生体内に多く含まれる元素の放射性同位元素により置換された化合物を用いて、それら化合物から放出される放射線量を測定する方法が非常に感度がよく、しかも、これら物質の化学的な性質は通常の化合物と変わらないので、細胞の代謝活動に影響を与えることなく、生体内と同様の現象が観察可能である。

【0024】

また、蛍光物質による標識は比較的容易で、蛍光物質として低分子化合物もあるので、このような物質を用いれば細胞の代謝に与える影響は少ない。また、抗体抗原反応を用いた定量法によって細胞で産生された物質などを定量する場合、蛍光物質で標識された抗体は種々市販されており、測定感度も高いので、蛍光測定による評価は有効である。

【0025】

更に、発光物質から発せられる蛍光量を測定する方法では、発光量は高感度に測定が可能なため、ごくわずかな変化も捕らえることが可能である。スクリーニング物質による接觸なため、細胞の増殖、分化、あるいは物質産出に伴って発現される遺伝子が特定されている場合には着や増殖、分化、あるいは物質産出に伴って発現される遺伝子が特定されている場合には、その遺伝子付近にルシフェラーゼ遺伝子などを導入しておき、遺伝子発現とともに産出されるルシフェラーゼ量をATPとルシフェリンの添加で生じる発光量により測定する。このことにより、スクリーニング物質による影響を発光量で評価することが可能である。

【0026】

色素の吸着度を測定する方法では、酵素反応などを併用することにより色素による吸光度の増幅が可能で、微量の物質の定量も可能となる。

【実施例】

【0027】

以下実施例により本発明を更に詳細に説明する。なお、特に表示していない限りは「%」は質量基準である。

【0028】

実施例1

ポリスチレン製細胞培養用基板1の全面に固定用の架橋材として、ポリLリジン（Poly-L-lysine）とトレシルクロライド（Tresylchloride）によってトシリ化された活性化デキストラン溶液を塗布した。

【0029】

サーマルジェット法によりインクジェットプリンターであるキヤノン（株）社製BJF

930のインクジェットカートリッジを70%エタノール水溶液で十分に洗浄し、10mM酢酸溶液中に溶解したIGF-Iを50%エタノール水溶液で希釈し、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した。この溶液をインクジェットプリンターのカートリッジに充填し、吐出してベース11上へ配置した。描画パターンはプリンターを接続したパソコンコンピューターにより制御し、1ドロップレットのサイズは約4ピコリットルであった。活性化デキストランでコートされたベース11上にIGF-I溶液を吐出後、4℃の湿潤はこの中で12時間静置した。このようにしてIGF-Iを固定した部分を作製した。同様にして、ベース11の部分にbFGFを固定したもの、bFGFとIGF-Iを固定したもの、さらに固定化領域によってこれらの濃度を変化させたものを作製した。生物活性物質を固定化後、1%ゼラチン溶液を用いて、未反応の活性化デキストランをブロックした。

【0030】

この基板上でマウス骨格筋細胞株C2C12を培養した。培養液はFBS (Fetal Bovine Serum)を2%含むDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's minimum essential medium) を用いた。まず、ステージ15の上面部分より下の部分にのみ培養液が接触するような状態で5%CO₂を含む湿潤空気(95~100%RH) 中で37℃、72時間培養した。培養後の細胞を10%ホルマリンで15分間、メタノールで15分間処理し、DNAを蛍光色素TOTO-3、筋分化を一次抗体のMF20と二次抗体IRDye800を用いて染色し、蛍光強度を測定した。基板上の細胞の増殖の指標をTOTO-3の700nmの蛍光強度、筋分化の指標をIRDye800の相対蛍光強度とした。

【0031】

bFGFのみの領域は濃度依存的に細胞増殖が促進され、IGF-Iのみの領域は濃度依存的に筋分化が促進された。しかし両者が存在する領域では筋分化が抑制されたことから、IGF-Iの作用はbFGFによって抑制されることがわかった。このように2種類であっても、成長因子の種類と組み合わせによって細胞分化の様子が異なることが判別できた。

【0032】

実施例2

次に、3種類の成長因子を用いて、ベース11上に異なる濃度を組み合わせて基板を作製した。bFGF、IGF-I及びBMP-2を実施例1と同様の方法でベース11上に固定及び仮固定した。ステージ15部分まで浸るように培養液を加え、成長因子をすべて再溶解させた。

【0033】

その後この基板上で、実施例1と同様の培養液でC2C12を96時間培養し、筋分化の指標としてクレアチニナーゼ(CK)の比活性、骨分化指標としてアルカリフосфатаз(Alkaline Phosphatase, ALP)の比活性を測定した。

【0034】

その結果、BMP-2が0の領域では実施例1と同様の結果が得られたが、BMP-2の濃度が増加するにしたがって全体的にCKの比活性は低下し、ALPの比活性が上昇した。またBMP-2が高い濃度の領域でも、bFGFやIGF-IによってALPの比活性は低下した。つまり、BMP-2によって筋分化は抑制され骨分化が促進されるが、BMP-2の作用もIGF-IやbFGFによって抑制されることがわかった。

【0035】

次に、BMP-2のみをステージ15上に配置した。24時間後まではBMP-2が培養液に触れないようにし、上記と同一の条件でこの基板上でC2C12を培養した。24時間後に、ステージ15部分まで浸るように培養液を追加し、BMP-2を再溶解させた。その後、上記条件でさらに72時間培養し、基板上での骨分化と筋分化を測定した。

【0036】

その結果、培養開始から24時間後にBMP-2を加えても骨分化は促進されず、筋分化も抑制されなかった。つまり骨分化を促進させるには、培養開始から24時間以内にBMP-2を加えることが必要であるとわかった。このように、組み合わせる成長因子の種類と、作用させる時期を変化させることで、それぞれ異なる分化の様子を観察できた。

【0037】

実施例3

作用させる生物活性物質の期間と濃度によって細胞への影響がどのように変化するかを調べるため、以下の方法を用いた。

【0038】

生物活性物質としてIGF-Iを用いた。5%グリセリンとIGF-Iを $20\mu\text{g}/\text{ml}$ と含む溶液を作成した。インクカートリッジを70%エタノールで洗浄後、生物活性物質を含む溶液を充填した。実施例1と同様に、ベース11上に活性化デキストランによる処理を施した。

【0039】

図3のように、ベース11上と壁面14上にIGF-Iをインクジェットプリンターで吐出した。壁面にはIGF-Iを固定した。ベース11上にIGF-Iを固定した後、未反応の活性化デキストランをゼラチン溶液でブロックした。FBSを2%含むDMEMに懸濁したマウス骨格筋細胞株C2C12を24穴の透明マイクロプレートに加え、ベース11上のIGF-Iを溶解させた。培養開始から一定時間後に培養液を追加して壁面14のIGF-Iを溶解し、 CO_2 が5%含まれる湿潤空気中で37℃の条件で計96時間培養した。

【0040】

培養開始後、次の条件で培養液を追加してIGF-Iを溶解させた。

- (1)追加なし
- (2)36時間後
- (3)36時間後と72時間後

培養後の細胞を10%ホルマリンで10分間処理し、IGF-Iによる筋分化の指標としてクレアチニナーゼ(CK)の酵素活性染色を行った。

【0041】

この結果、IGF-Iの総量によって筋分化への影響が変化した。上記の各条件において、CKによる染色部位は(1)<(2)<(3)の順に増加した。このことから、培養期間を通して培養液中に存在するIGF-I量によって筋分化の促進の程度が異なることがわかった。このように段階的に生物活性物質を加えることのできるマイクロプレートによって、作用期間による変化を調べることが可能である。

【0042】

実施例4

次に、作用させる生物活性物質の期間と濃度によって細胞への影響がどのように変化するかを調べるため、以下の方法を用いた。

【0043】

生物活性物質としてIGF-I)とbFGFを用いた。5%グリセリンとIGF-IもしくはbFGFを $20\mu\text{g}/\text{ml}$ と含む溶液を作成した。インクカートリッジを70%エタノールで洗浄後、生物活性物質を含む各溶液を充填した。実施例1と同様に、ベース11に活性化デキストランによる処理を施した。

【0044】

図3のように、ベース11上にIGF-Iを固定化し、壁面14上にbFGFをインクジェットプリンターを用いて16種類の濃度の組み合わせを5つ配置した。このようにしてIGF-Iはベース11上に固定化し、bFGFは壁面14に仮固定した。FBSを2%含むDMEMに懸濁したマウス骨格筋細胞株C2C12をベース11に加えた。培養開始から一定時間後に培養液を加え、壁面14上のbFGFを溶解させた。すべての筋細胞を CO_2 が5%含まれる湿潤空気中で37℃の条件で96時間培養した。培養液を追加する時間は以下の5通りである。

- (1)培養開始直後
- (2)培養開始12時間後
- (3)培養開始24時間後
- (4)培養開始48時間後
- (5)培養開始72時間後

培養後の細胞を10%ホルマリンで10分間処理し、IGF-Iによる筋分化の指標としてクレアチニナーゼ(CK)の酵素活性染色を行った。

【0045】

この結果、bFGFを作用させるタイミングによって筋分化への影響が変化した。壁面14上にbFGFを配置しなかった場合と上記の条件において(4)及び(5)ではCKによって染色された部位が多く確認されたが、(1)、(2)及び(3)では染色部位がほとんど見られなかつた。また、bFGFの濃度が上昇するほど染色部位が減少した。このことから、筋細胞分化させる際、培養開始24時間以内にbFGFを加えると筋分化が著しく抑制されることがわかつた。このように段階的に生物活性物質を加えることのできるマイクロプレートによつて、作用期間による変化を調べることが可能である。

【0046】

実施例5

本実施例は、変異原性物質を他の物質と組み合わせた基板上でサルモネラ菌TA98株を培養し、その復帰突然変異性を定量化することで変異原性の変化を評価するものである。本実施例では、グルコースを含む寒天で覆われた基板上に、図5に示すように特定の領域内に各変異原性物質、アジ化ナトリウム、アフラトキシンB1、アセトヘキサミドを濃度を変えて仮固定した。変異原性物質が仮固定されていない領域を○、アジ化ナトリウムを仮固定した領域を○、●、アフラトキシンB1を仮固定した領域を「縦縞を有する丸」、アセトヘキサミドを仮固定した領域を「点々を付した丸」で表しており、それぞれ濃度の高い方を濃く表してある(●、縞模様及び点々が高密度の丸)。各変異原性物質が単独で仮固定された領域と、組み合わせて仮固定された領域を設けた。

アジ化ナトリウム、アフラトキシンB1、アセトヘキサミドは予めナトリウム-リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解しておき、70%エタノールで洗浄したインクカートリッジにそれぞれ溶液を充填した。インクジェットプリンターを用いて上記の基板上に各変異原性物質をプリント後、仮固定した。

衛生試験法に基づき、液体培地中に増殖させたサルモネラ菌TA98株の菌懸濁液0.1mLと、L-ヒスチジンとD-ビオチンを含む寒天溶液2mLをよく混合して上記の基板上に添加した。添加した寒天を室温で基板上に固化させたのち、細菌を37°Cで48時間培養し、復帰突然変異によって増殖したコロニー数を定量した。

この結果、各物質を単独で仮固定した領域は濃度依存的にコロニー数が増加し変異原性が確認された。しかしアジ化ナトリウムとアフラトキシンB1を加えた場合は細菌が死滅してしまい、変異原性よりも細胞毒性が強まることがわかつた。アジ化ナトリウムとアセトヘキサミドを加えた場合は、各々単独で加えた場合の和よりも著しくコロニーが増殖し、変異原性の相乗作用が確認された。アフラトキシンB1とアセトヘキサミドを加えた場合は特に相乗作用は見られなかつた。3種類すべてを組み合わせた場合も細菌が死滅し、細胞毒性が強まつた。

このように本基板を用いることで、複数の物質の組み合わせによる変異原性や細胞毒性の変化を評価することが可能である。

【0047】

実施例6

本実施例は、基板上で変異原性物質と他の物質を時間差で組み合わせ、サルモネラ菌TA98株に対する復帰突然変異性を定量化することで変異原性の変化を評価するものである。本実施例では、グルコースを含む寒天で覆われた基板上に、図6に示すように特定の領域内に各変異原性物質、アジ化ナトリウム、アフラトキシンB1を濃度を変えて固定化した。変異原性物質が固定化されていない領域を○、アジ化ナトリウムを固定化した領域を○、●、アフラトキシンB1を固定化した領域を「縦縞の丸」で表しており、それぞれ濃度の高い方を濃く表してある(●、縞模様が高密度の丸)。各変異原性物質が単独で固定化された領域と、組み合わせて固定化された領域を設けた。

【0048】

アジ化ナトリウムとアフラトキシンB1は予めナトリウム-リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解しておき、70%エタノールで洗浄したインクカートリッジにそれぞれ溶液を充填した。インクジェットプリンターを用いて上記の基板上に各変異原性物質をプリント後、固定化した。

【0049】

各濃度のアセトヘキサミドを含む液体培地0.5m lにサルモネラ菌TA98株の菌懸濁液を0.1m lずつ加え、37°Cで20分間振とう培養した。アセトヘキサミド溶液は「点々の模様」で表してある。その後、L-ヒスチジンとD-ビオチンを含む寒天溶液2m lとよく混合して上記の基板上に添加した。添加した寒天を室温で基板上に固化させたのち、細菌を37°Cで48時間培養し、復帰突然変異によって増殖したコロニー数を定量した。また3種類の変異原性物質のうち、固定化するものと前培養するものの組み合わせを変えて同様の実験を行った。この結果、各物質が単独で存在する領域は濃度依存的にコロニー数が増加し、変異原性が確認された。しかしあセトヘキサミド共存下で前培養した後に、アジ化ナトリウムとアフラトキシンB1を作用させた場合は細菌が死滅せず、3種を同時に加えた場合よりも細胞毒性が弱まることがわかった。また、時間差投与によって、全体的に変異原性が変化することがわかった。このように本基板を用いることで、複数の物質の組み合わせと時間差投与による変異原性や細胞毒性の変化を評価することが可能である。

【産業上の利用可能性】

【0050】

以上述べたように、本発明を利用して複雑な多元系の成長因子の解析を簡便に短時間で行うことが可能となり、特に、生科学、再生医療の分野での利用価値は高い。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】本発明にかかる細胞培養用基板の製造方法の一例を説明するための図である。

【図2】本発明にかかる細胞培養用基板の一例を説明するための平面図である。

【図3】本発明にかかる細胞培養用基板の一例を説明するための断面図である。

【図4】本発明にかかる細胞培養用基板の一例を説明するための断面図である。

【図5】本発明にかかる細胞培養用基板の一例を説明するための平面図である。

【図6】変異原性のスクリーニング方法の一例を説明するための図である。

【符号の説明】

【0052】

1 細胞培養基板

2 成長因子A

3 成長因子B

4 成長因子C

5 成長因子D

6 成長因子E

1 1 ベース

1 2 生物活性物質を含む液体

1 3 吐出手段

1 4 壁面

1 5 ステージ

1 6 傾斜した壁面

1 7、1 7' アジ化ナトリウムを仮固定した領域

1 8、1 8' アフラトキシンB1を仮固定した領域

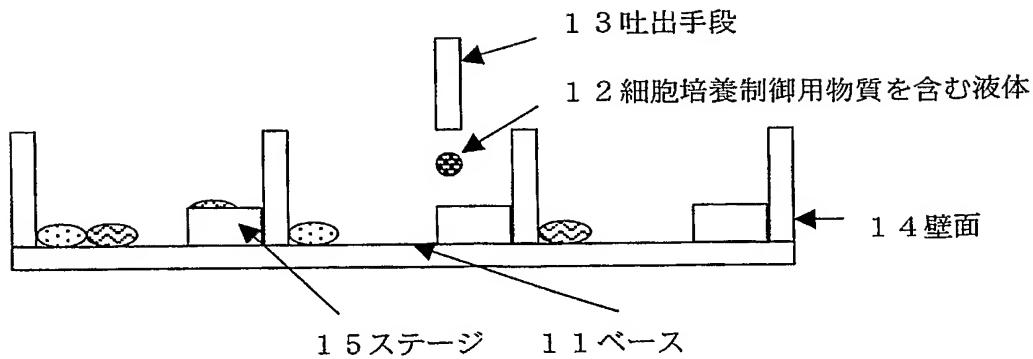
1 9、1 9' アセトヘキサミドを仮固定した領域

2 0 アセトヘキサミド溶液と前培養した菌懸濁液

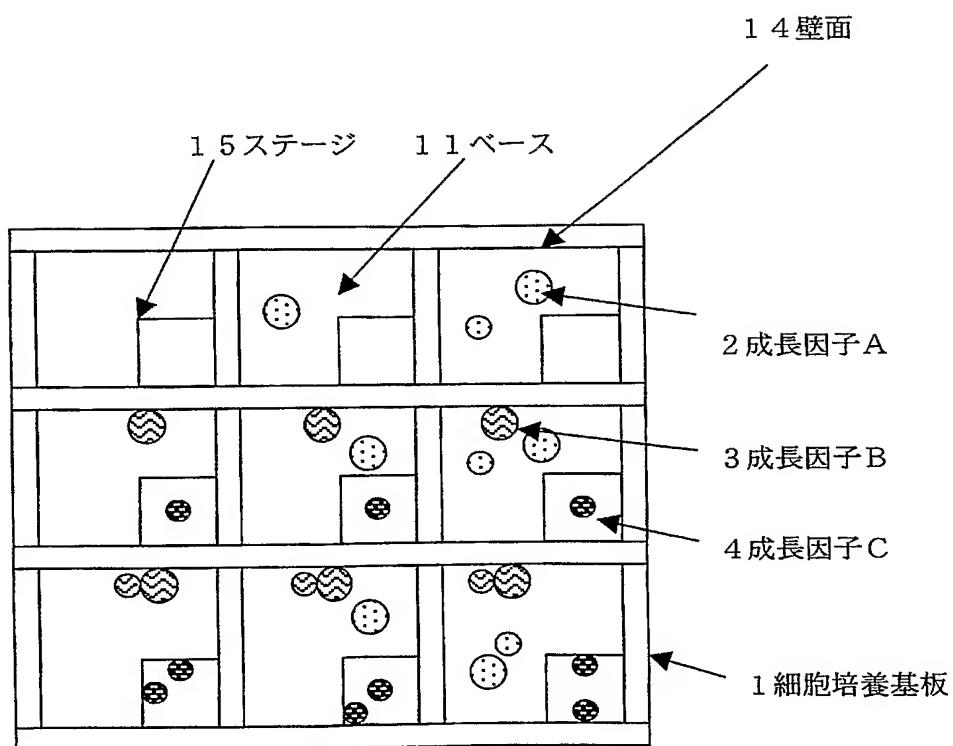
2 1、2 1' アジ化ナトリウムを固定化した領域

2 2、2 2' アフラトキシンB1を固定化した領域

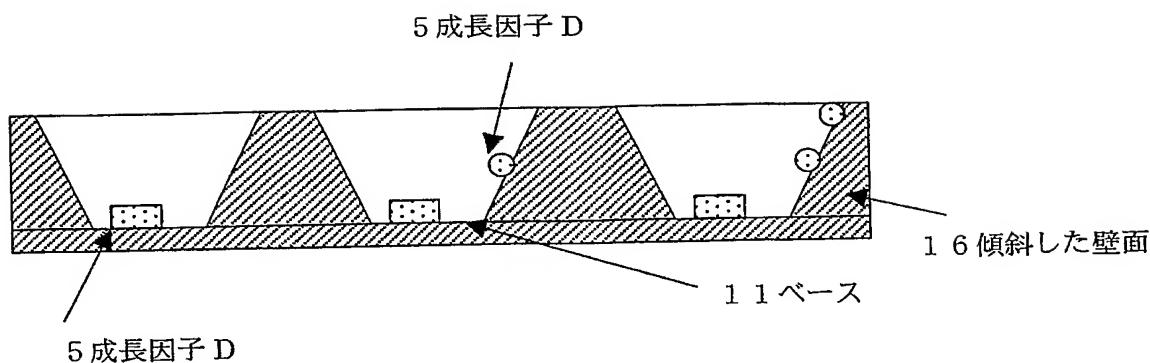
【書類名】 図面
【図1】



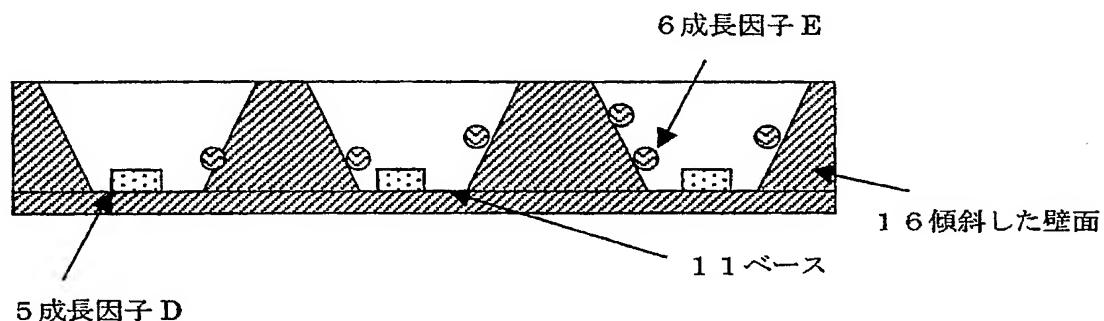
【図2】



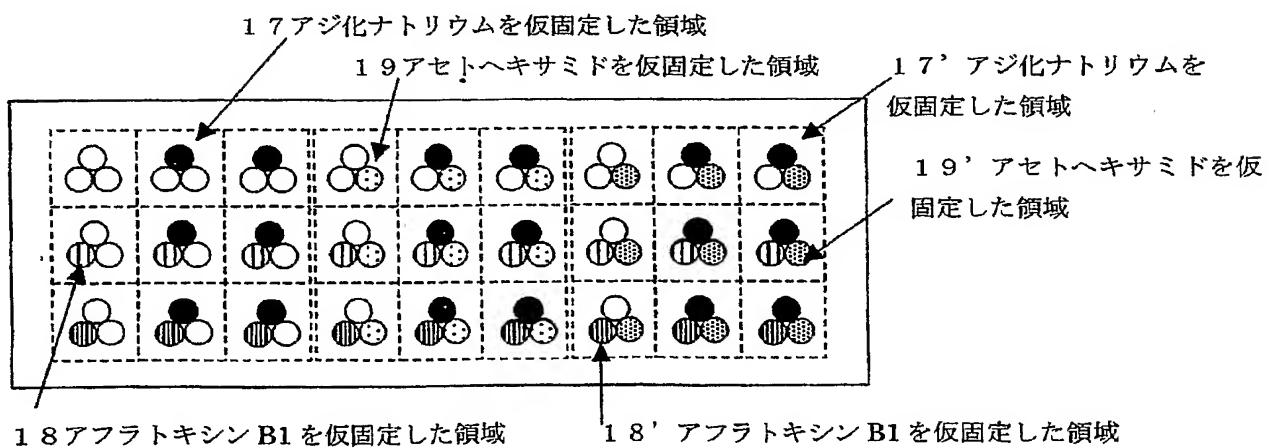
【図3】



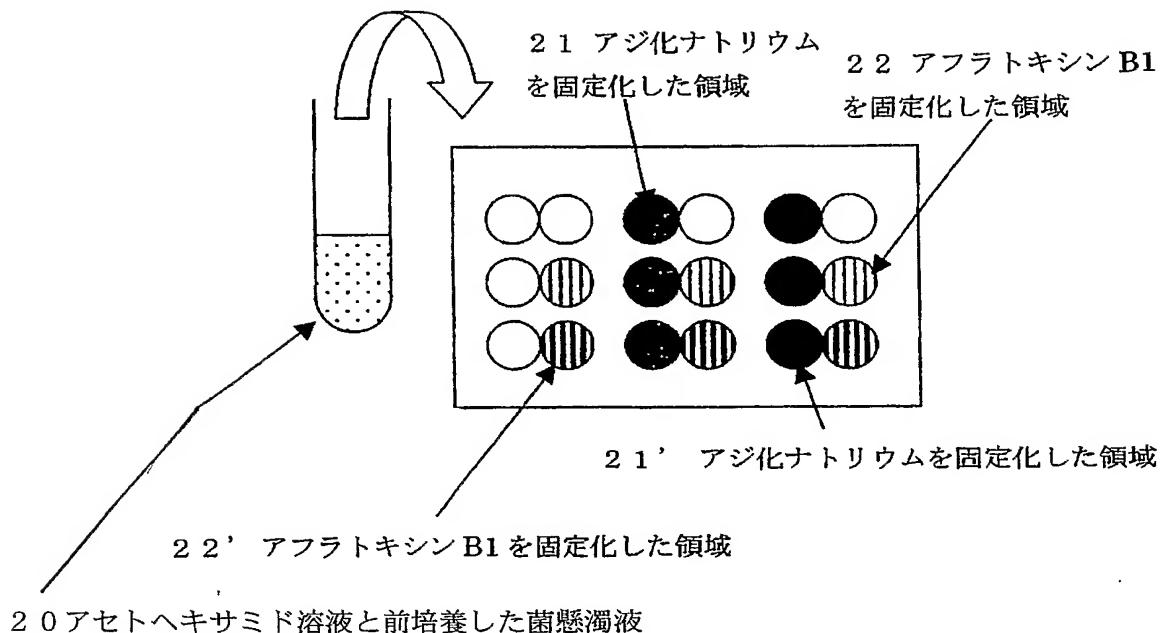
【図4】



【図5】



【図6】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 簡便な工程で形成できる細胞スクリーニング基板及びその製造方法を提供すること。

【解決手段】 基板に設けた複数の培養領域の各々に、細胞に対して生物活性を有する生物活性物質の供給源としての保持領域および生物活性物質の固定化領域を設け、少なくとも1種の生物活性物質が保持領域から遊離可能である細胞培養用基板を、前記複数の領域に、生物活性物質の組み合わせが異なる複数の領域が含まれているかつ/または生物活性物質の密度が異なる複数の領域が細胞培養用基板の高さの異なる複数の部分に存在するよう構成する。

【選択図】 図1

特願 2003-418560

出願人履歴情報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏名 キヤノン株式会社